



PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : G01N 15/14, 27/22, 33/487, B03C 5/00	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/37920 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 29. Juni 2000 (29.06.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP99/10278 (22) Internationales Anmeldedatum: 21. Dezember 1999 (21.12.99) (30) Prioritätsdaten: 198 59 460.7 22. Dezember 1998 (22.12.98) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): EVOTEC BIOSYSTEMS AG [DE/DE]; Schnackenburgallee 114, D-22525 Hamburg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FUHR, Günter [DE/DE]; Kavalierstrasse 15, D-13187 Berlin (DE). MÜLLER, Torsten [DE/DE]; Hartriegel Strasse 39, D-12439 Berlin (DE). SCHNELLE, Thomas [DE/DE]; Koppenstrasse 65, D-10243 Berlin (DE). GRADL, Gabriele [DE/DE]; Thomasiusstrasse 8, D-10557 Berlin (DE). (74) Anwalt: HERTZ, Oliver; Von Bezold & Sozien, Akademiestrasse 7, D-80799 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i>
(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR ELECTRO-OPTICAL SPECTROSCOPY OF INDIVIDUAL PARTICLES (54) Bezeichnung: VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR ELEKTRO-OPTISCHEN EINZELPARTIKELSPEKTROSKOPIE (57) Abstract <p>In order to effect dielectric spectroscopy on at least one suspended particle (11) in a microsystem, the particle (11) is exposed to high frequency electric rotating fields in an electrode array (16) and maintained in the focus (14) of an optical trap.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Zur dielektrischen Spektroskopie an mindestens einem suspendierten Teilchen (11) in einem Mikrosystem wird das Teilchen (11) in einer Elektrodenanordnung (16) hochfrequenten elektrischen rotierenden Feldern ausgesetzt und im Fokus (14) einer optischen Falle gehalten.</p> <div data-bbox="581 1186 1437 1816"> </div>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren und Vorrichtung zur elektro-optischen Einzelpartikelspektroskopie

Die Erfindung betrifft Verfahren zur dielektrischen Einzelpartikelspektroskopie in Mikrosystemen und Vorrichtungen zu deren Implementierung.

Zur Vermessung der passiven elektrischen Eigenschaften von in Flüssigkeiten suspendierten Teilchen oder Mikroobjekten (wie Latexpartikeln, lebende Zellen etc.) werden seit langem über elektrische Rotationsfelder induzierte Drehbewegungen genutzt [Übersicht in ZIMMERMANN, U. et al., Electromanipulation of Cells, CRC Press Inc., 1996]. Es kann sich dabei um eine Rotationsbewegung in oder entgegengesetzt zur Felddrehrichtung handeln. Aus der Drehgeschwindigkeit des Objektes als Funktion der Winkelgeschwindigkeit des Feldes (sogenannte Rotationsspektren) kann auf passive elektrische Eigenschaften geschlossen werden. In der Regel liegen die Rotationsgeschwindigkeiten der Objekte im Bereich von 100 Umdrehungen pro Sekunde bis zu 1 Umdrehung pro Minute, typischerweise langsamer als 1 Umdrehung pro Sekunde.

Insbesondere für biologisch-medizinische Fragestellungen hat sich dieses Verfahren als der Impedanzmessung vergleichbar und hochauflösend erwiesen. Die Rotation des Objektes verhält sich dabei proportional zum Imaginärteil des Clausius-Mosotti-Faktors, [vgl. auch JONES, T.B., Electromechanics of Particles, Cambridge University Press, Cambridge, 1995].

Nachteilig ist jedoch, daß zusätzlich zu dem induzierten Drehmoment immer eine zu den Elektroden hin oder von diesen weg gerichtete Kraft, die sogenannte Dielektrophorese, auftritt. Dadurch

dejustiert sich das Partikel bzw. verkürzt sich die Meßzeit unkontrolliert. Beides steht einer automatischen Messung entgegen.

Versuche, die Rotationsmessung automatisch zu erfassen, sind mehrfach beschrieben worden [DE 33 25 843; DD WP 281223 (1986)]. Dabei handelt es sich um die alternierende Applikation zweier Anregungsfelder unterschiedlicher Drehrichtung, bei denen die Anschaltzeiten elektronisch verändert werden können. Diese werden so lange variiert, bis der Stillstand des Objektes eintritt. Der Stillstand des Objektes wurde bislang jedoch ebenfalls ausschließlich über visuelle Beobachtung bestimmt.

Desweiteren ist bekannt, die Bewegung komplex strukturierter Objekte über Bildverarbeitungssysteme zu erfassen. Dazu wird das mikroskopisch erzeugte Bild zu verschiedenen Zeitpunkten elektronisch aufgenommen und gespeichert und dann versucht, über eine entsprechende Raumtransformation einer Vielzahl von Bildpunkten die erfolgte Bewegung zu rekonstruieren. Diese Verfahren haben den Nachteil einer hohen Informationsverarbeitungsdichte und damit langwieriger und aufwendiger Rechnerverarbeitung. Besonders große Schwierigkeiten treten bei Veränderungen der Objektstruktur während der Messung auf, z.B. bei Verlagerung in der Fokusebene, und bei schwach kontrastierten Objekten.

Automatisch kann die Zellbewegung auch über Verfahren der dynamischen Lichtstreuung ermittelt werden [GIMSA, J., PRÜGER, B., EPPMANN, P. and DONATH, E., Electrorotation of particles measured by dynamic light scattering - a new dielectric spectroscopy technique, in "Colloids and Surfaces A", Bd. 98, 243-249, 1995]. Dieses Verfahren kann allerdings nicht an einzelnen Objekten eingesetzt werden, sondern liefert Mittelwerte über alle Partikel, die sich im Laserstrahl befinden. In der Regel sind dies einige Hundert oder mehr.

Die exakte Positionierung an einem Punkt im elektrischen Rotationsfeld wurde durch die Verwendung 3-dimensionaler Elektrodenanordnungen, sogenannter Feldkäfige, und die alternierende Applikation eines Zentrierfeldes und eines Rotationsfeldes gelöst. Es zeigt sich allerdings, daß dadurch die Rotation der Objekte auf 1/10 bis 1/40 verlangsamt wird, was eine Auswertung erschwert und die Meßzeiten verlängert (DE 196 53 659 C1, sowie Schnelle, Th., Glasser, H., Fuhr, G., An opto-electronic technique for automatic detection of electrorotational spectra of single cells, in "Cellular Engineering" Bd. 2, 33-41, 1997).

Es sind ferner optische Feldfallen, auch "optical tweezers", "Laser-Pinzetten" oder "optical traps" genannt, bekannt, die seit etwa zwei Jahrzehnten auf den Gebieten der Biotechnologie, Medizin und Molekularbiologie sowie auf anderen technischen Gebieten zur Positionierung und Manipulation mikrometergroßer und sub-mikrometergroßer Partikel eingesetzt [G. Weber et al. in "Int. Rev. Cytol." Bd. 131, 1992, S. 1; S.M. Block in "Noninvasive Techniques in Cell Biology", Wiley-Liss., New York 1990, S. 375] werden. Die Entwicklung der Laser-Pinzette geht vor allem auf A. Ashkin zurück [A. Ashkin in "Phys. Rev. Lett.", Bd. 24, 1970, S. 156]. Das Prinzip des Partikeleinfangs durch optisch induzierte Kräfte beruht darauf, daß neben dem Lichtdruck, der stets ein Teilchen von der Lichtquelle wegdrückt, Gradientenkräfte auftreten, die dazu führen, daß ein Teilchen in einen Fokus gelangt bzw. stabil in diesem gehalten oder mit diesem bewegt wird. Voraussetzung ist, daß die Absorption und Reflexion des Teilchens gering ist, während der Unterschied im Brechungsindex zur Umgebungslösung möglichst groß sein sollte.

Laser-Pinzetten haben in den letzten Jahren vor allem deshalb eine größere Verbreitung erlangt, weil bei gleicher, stets starker Fokussierung des Lichtstrahls sowohl Teilchen, die größer als die

Wellenlänge (sogenannte Mie-Teilchen), als auch Teilchen, die kleiner als die Wellenlänge sind (sogenannte Rayleigh-Teilchen), gefangen werden können. Das sind vor allem biologische Objekte wie Zellen, Organellen und andere Zellbestandteile und auch große Moleküle (wie DNA) und künstliche Mikropartikel [S.M. Block et al. in "Nature", 1990, S. 348; J. M. Colon et al. in "Fertility and Sterility", Bd. 57, 1992, S. 695 ff.].

Von G. Fuhr et al. wird in "Topics in Current Chemistry", Bd. 194, Springer-Verlag Berlin, 1998, S. 83 ff., ein Mikroelektrodensystem beschrieben, bei dem auf suspendierte Partikel elektrische, optische oder hydrodynamische Kräfte wirken. Es wird die Realisierung von Hybridprozessen beschrieben, bei denen Partikel abwechselnd erst mit elektrischen oder mit optischen Kräften manipuliert werden. Dieser Einsatz elektrischer oder optischer Kräfte ist dabei auf die Erfüllung bestimmter Ziele bei der Partikelhandhabung gerichtet. Mit den elektrischen Kräften erfolgen insbesondere elektrische Messungen an den Partikeln, wie sie oben erwähnt werden. Die optischen Kräfte hingegen dienen der Manipulierung der Partikel vor oder nach der elektrischen Messung. Die optischen Kräfte werden beispielsweise in Abhängigkeit vom Ergebnis der elektrischen Messung ausgeübt (Sortieren). Die simultane Wirkung elektrischer und optischer Kräfte ist nicht vorgesehen.

Das Zusammenwirken elektrostatischer und optischer Kräfte bei der Erfassung schrittweiser Verstellungen von biologischen Zellen in Mikrosystemen wird von M. Nishioka et al. in "IEEE Transactions on Industry Application", Bd. 33, 1997, S. 127 ff., beschrieben. Unter der Wirkung des Strahlungsdrucks eines Lasers werden die zu untersuchenden Zellen gegen ein Deckglas über einer Elektrodenanordnung gedrückt, mit der umschaltbare elektrostatische Felder erzeugt werden. Die Zellen werden in Bezug auf ihre Orientierung in den elektrischen Feldern untersucht. Die Manipulation der Zellen bleibt bei dieser sogenannten optoelektrostatischen Technik

auf geringe Verstellraten beschränkt. Es wurde festgestellt, daß bei Verstellgeschwindigkeiten mit typischen Zeiten von 0,5 s die Zellbewegung nicht mehr den gewünschten Manipulierungsschritten folgt. Ein weiterer Nachteil der von M. Nishioka et al. beschriebenen Technik besteht in deren Beschränkung auf nicht-sphärische Partikel oder Partikel mit einer inhomogenen Struktur. Die oben genannte Messung passiver elektrischer Eigenschaften durch Aufnahme von Rotationsspektren ist mit der optoelektrostatischen Technik nicht möglich.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, neue Verfahren zur dielektrischen Einzelpartikelspektroskopie in Mikrosystemen und Vorrichtungen zu deren Implementierung anzugeben, mit denen die o. a. Probleme gelöst werden können und insbesondere die Teilchen in einem Rotationsfeld unabhängig davon, ob anziehende oder abstoßende dielektrophoretische Kräfte auftreten, freischwebend in einer Lösung an einem beliebigen Punkt mit einer Genauigkeit unterhalb des Partikelradiuses im Rotationsfeld zu halten, ohne daß die Rotationsgeschwindigkeit vermindert wird.

Diese Aufgabe wird durch die Kombination eines optischen Fangstrahl („optische Pinzette“) und einem oder mehreren rotierenden elektrischen Feldern variabler Winkelgeschwindigkeit mit den Merkmalen der Ansprüche 1 bzw. 6 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Anwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Wichtige Gesichtspunkte der Erfindung bestehen insbesondere darin, daß ein suspendiertes Teilchen (Partikel), das künstlich oder auch biologischer Natur sein kann, in einem stark fokussierten Laserstrahl gefangen wird, wie es von optischen Pinzetten bekannt ist. Der Fangpunkt des Lasers mit dem darin befindlichen Teilchen wird nun zwischen Mikroelektroden, die in der Regel planar auf ein glattes Substrat aufgebracht sind, geführt, bis sich das

Teilchen im Bereich des sich in der Lösung ausbreitenden elektrischen Feldes befindet, sofern die Elektroden mit hochfrequenten, in geeigneter Weise phasenverschobenen Wechselspannungssignalen beaufschlagt werden. Das Teilchen befindet sich im Zustand freier Suspension. Es wird durch das Zusammenwirken elektrischer und optischer Kräfte gehalten.

Zweckmäßigerweise positioniert man den Laserfokus auf einer Linie die senkrecht auf dem Punkt steht, der das Feldminimum zwischen den Elektroden bezeichnet. Selbst wenn Kräfte durch das elektrische Rotationsfeld entwickelt werden, die das Teilchen an die Elektroden ziehen wollen, wirken diese an diesem Ort in alle Elektrodenrichtungen ziemlich gleichmäßig, so daß es erfindungsgemäß nur sehr geringer Kräfte bedarf, das Teilchen trotz der feldinduzierten Anziehungskräfte stabil im Laserfokus zu halten. Andererseits muß die Intensität des Lasers so hoch gewählt werden, daß das Teilchen angehoben wird. Sollte das Teilchen über die elektrisch induzierten Polarisationskräfte von den Elektroden abgestoßen werden, so sind die Kräfte des optischen Feldes noch geringer wählbar, da sich das Teilchen selbst auf der bezeichneten Symmetrielinie zentriert. Hier wird es jedoch angehoben und aus dem Elektrodenbereich gedrängt. Diese Kraft muß wiederum über die Wahl der Intensität des Laserstrahl kompensiert werden. Dieses auf optisch induziertem Wege sehr stabil in freier Lösung gefangene Teilchen erfährt durch das elektrische Drehfeld ein Drehmoment und kann frequenzabhängig in der an sich bekannten Art in langsame Drehung versetzt werden.

Es handelt sich somit um ein Verfahren und eine elektro-optischen Vorrichtung zur automatischen Rotationsmessung an einzelnen Mikropartikeln, insbesondere zur Messung der Rotationsgeschwindigkeit von lebenden Zellen als Funktion der Rotationsfrequenz eines elektrischen Feldes, wobei die Halterung des Meßobjektes im Rotationsfeld in einem Laserfokus erfolgt.

Ein besonderer Vorteil dieses Verfahrens besteht darin, daß beide Kräfte (optisch und elektrische) sich nahezu wechselwirkungsfrei ergänzen und wechselseitig optimiert verringert werden können. Das optische Fangfeld ist zudem von der Leitfähigkeit der Suspensionslösung unabhängig, so daß in unbegrenzter Weise in leitfähigen bis wenig leitfähigen Lösungen gearbeitet werden kann, was bisher nicht möglich war. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß erfindungsgemäß sehr eng stehende Elektroden verwendet und damit anwendungsabhängig mit geringeren Amplituden gemessen werden kann. Ferner lassen sich neue Elektrodenformen zur Erzeugung von Feldgradienten einsetzen, was bisher ausgeschlossen war. Damit wird der Einsatzbereich der dielektrischen Spektroskopie erheblich erweitert.

Durch die überaus präzise (auf einen Mikrometer und weniger) genaue Positionierung der Teilchen lassen sich nunmehr in sehr einfacher Weise automatische Meßverfahren, z.B. der Bilderkennung und der Streulichtmessung etc. zur automatischen Erfassung der Rotationsspektren der Partikeln adaptieren. Dies geschieht in bekannter Weise, z.B. über eine mikroskopische Beobachtung.

Im folgenden sind die wesentlichen Merkmale der Erfindung an in den Zeichnungen dargestellten Ausführungsbeispielen erläutert. Es zeigen:

Figur 1: eine Übersichtsdarstellung zur erfindungsgemäßen Halterung eines Teilchens in einer Quadrupolanordnung zur dielektrischen Spektroskopie mit einer Laser-Pinzette;

Figur 2: eine Kurvendarstellung der Abhängigkeit des Drehmomentes bzw. der an- oder abstoßenden Kräfte von der Frequenz f des Rotationsfeldes ($\omega = 2\pi f$);

Figur 3: eine Übersichtsdarstellung zur erfindungsgemäßen Kombination eines Mikrosystems zur dielektrischen Spektroskopie mit einer Mikroskopanordnung, und

Figur 4: eine schematische Illustration eines Mikrosystems für Screening-Aufgaben.

Figur 1 zeigt einen perspektivischen Blick auf die Anordnung. Einzelheiten des Mikrosystems, die an sich bekannt sind, werden nicht dargestellt. Ein Partikel 11, suspendiert in einer Umgebungslösung 12, befindet sich im Strahlungsfeld eines stark fokussierten Laserstrahls 13 und wird im Fokus 14 gefangen. Vier planar auf einem Substrat 15 befindliche, in der Regel planare Elektroden 16a bis 16d werden über 90 Grad phasenverschobene Signale (Phasenlage 0° , 90° , 180° , 270°) gleicher Frequenz (Amplituden z. B. etwa 1 bis 20 V) angesteuert, so daß ein Drehfeld in der x-y-Ebene entsteht. Entsprechend dreht das gefangene Partikel durch die starken Reibungskräfte gegenüber der Suspensionsflüssigkeit 12 wesentlich langsamer, als das Feld rotiert. Die Rotationsgeschwindigkeit des Objektes als Funktion der Frequenz wird durch Vermessung oder Beobachtung des Teilchens ermittelt und liefert die gewünschten Rotationsspektren. Alternativ können auch 3 oder mehr Elektroden in einer Ebene, von stärkerer Dicke als auch in einer Mehrebenenanordnung verwendet werden.

Das in Fig. 1 gezeigte Mikrosystem kann vorteilhafterweise mit Resonanzeinrichtungen zur Ausbildung einer resonanten Erhöhung oder Dämpfung der Feldstärke der elektrischen Wechselfelder bei vorbestimmten Frequenzen ausgestattet sein, wie sie in PCT/EP96/05244 beschrieben sind. Der Inhalt der Patentanmeldung PCT/EP96/05244 wird hiermit vollständig durch ausdrückliche Bezugnahme in den Inhalt der vorliegenden Beschreibung einbezogen. Dies betrifft insbesondere alle Maßnahmen zur Erzeugung von Reso-

nanzerscheinungen in Partikelsuspensionen in Mikroelektrodenanordnungen.

Figur 2 zeigt ein Rotationsspektrum (Kurve 21, das Spektrum einer lebenden Zelle beschreibend) und die dazugehörige dielektrophoretische Kraft (Kurve 22) an. Es zeigt sich, daß die Zelle ohne das optische Fangfeld im Frequenzbereich (ω) zwischen 20 Hz und 1 GHz an die Elektroden gezogen würde. Bei den dargestellten Kurven handelt es sich um eine Messung an einer 20 μm großen Zelle in einer wässrigen Lösung mit einer Leitfähigkeit von 1mS/m , wie sie für Algen typisch ist. Dadurch konnte bisher in diesem Frequenzbereich nicht oder nur mit verminderter Genauigkeit gemessen werden, wie dies oben erläutert wurde. Erfindungsgemäß wird mit der Laser-Pinzette die durch die Kurve 22 repräsentierte Kraftwirkung kompensiert. Entsprechend wird die Laser-Pinzette mit derartigen Betriebsparametern eingesetzt, daß eine genügend große Fangkraft auf das Teilchen ausgeübt wird.

Figur 3 zeigt eine Vorrichtung, die mindestens einseitig transparent ist, mit weiteren Einzelheiten, mit der die Rotationsmessungen durchgeführt werden können. Auf einem Substrat 31 (z.B. Glas) werden mit den Mitteln der Halbleitertechnologie planare Elektroden 32a bis 32d prozessiert und über die Zuleitungen 33a bis 33d mit Wechselspannungssignalen zur Rotationsfelderzeugung beaufschlagt. Durch die Seitenwände 34a, 34b und die weniger als 250 μm dicke Deckplatte 35 wird ein Kanal gebildet, in den die Partikelsuspension eingespült werden kann (36, Pfeilrichtung). Die Kanaldecke besteht aus Glas, so daß ein Objektiv 37 hoher numerischer Apertur, z.B. auch als Ölimmersionsobjektiv (Öl 38) einen stark fokussierten Laserfokus im Kanalinneren erzeugen kann, in dem das Partikel 39 gefangen wird. Sinngemäß können noch weitere Elektroden eingeführt werden und kann der Laserstrahl oder der Kanal relativ zueinander verschoben werden. Das Gesamtsystem ist als Zusatz zu einem Mikroskop ausführbar.

Eine bevorzugte Anwendung der Erfindung wird im folgenden unter Bezug auf Fig. 4 erläutert. Fig. 4 zeigt ein Mikrosystem, das für den Aufbau eines Testsystems (Assaysystem) für das Hochdurchsatzscreening ausgebildet ist. Das Mikrosystem 40 weist eine Kanalstruktur 41a, 41b auf. Der erste Kanal 41a wird von einer Suspension mit Partikeln durchströmt, die getestet werden sollen. Die Partikel umfassen beispielsweise biologische Zellen oder modifizierte synthetische Partikel oder Kombinationen aus biologischen Zellen und synthetischen Partikeln. Der zweite Kanal 41b, der von einer Lösung oder Suspension einer Testsubstanz durchströmt wird, mündet in den ersten Kanal 41a. Die Testsubstanz umfaßt vorzugsweise Liganden, z.B. Antikörper.

Stromaufwärts in Bezug auf die Einmündung des zweiten Kanals 41b ist am ersten Kanal 41a ein erstes Elektrodensystem 42a angebracht, das beispielsweise wie das Mikroelektrodensystem gemäß Fig. 1 aufgebaut ist. Stromabwärts gegenüber dem Mündungspunkt ist ein zweites Elektrodensystem 42b angeordnet. Die Elektrodensysteme 42a, 42b sind für Rotationsmessungen an den Partikeln 43 vor bzw. nach der Wechselwirkung mit der Testsubstanz ausgelegt. Jede Elektrodenanordnung ist mit einer Lasereinrichtung und einer Mikroskopanordnung zur Erzeugung der optischen Fallen ausgestattet (s. Fig. 3). Ein Testablauf könnte beispielsweise wie folgt realisiert werden.

Zunächst werden die anströmenden Partikel 43 im ersten Elektrodensystem 42a einer ersten Rotationsmessung (bei simultaner Halterung mit einer optischen Falle) unterzogen. Nach Vermengung mit der Testsubstanz ergeben sich Wechselwirkungen (z.B. Partikel 43a), deren Einfluß auf die Partikeleigenschaften durch die zweite Rotationsmessung im Elektrodensystem 42b erfaßt wird. Die geänderten Eigenschaften können absolut durch charakteristische Spektren oder relativ durch Vergleich der Spektren der ersten und

zweiten Rotationsmessungen ermittelt werden. Nach der zweiten Rotationsmessung werden die Partikel aus dem zweiten Elektroden-system freigegeben, ggf. weitere Rotationsmessungen in weiteren (nicht dargestellten) Elektrodenanordnungen unterzogen und je nach dem Meßergebnis einem Sortiervorgang unterzogen.

Typische Anwendungen für ein Testsystem gemäß Fig. 4 sind Bindungsstudien und die Ermittlung kinetischer Parameter (Assoziationskonstante, Dissoziationskonstante) im Rahmen der Charakterisierung von Wechselwirkungen zwischen Biomolekülen untereinander oder mit kleinen organischen oder anorganischen Molekülen. Biomoleküle und zugehörige Anwendungsbeispiele können dabei sein: Antigene-Antikörper, bei Studien zur Entwicklung von Immunoreagenzien und Imunoassays, Epitope-Mapping und Screening von Phagen-Bibliotheken; Liganden und ihre zellmembranständigen Rezeptoren; Zelladhäsionsmoleküle und ihre Liganden, z.B. bei Untersuchungen der Affinität zwischen Cadherinen und Integrinen und ihren zellmembranständigen Rezeptoren; Membranmoleküle, wie z.B. Lipide oder Glykoproteine, bei Untersuchungen der Wechselwirkung dieser Moleküle mit anderen löslichen oder zellmembranbeständigen Biomolekülen; extrazelluläre Matrixmoleküle und ihre löslichen oder zellmembranständigen Liganden; intrazelluläre Botenstoffe, bei Untersuchungen der Signalweiterleitung innerhalb der Zelle durch Wechselwirkung von Molekülen einer Signalweiterleitungskaskade; lösliche Proteine und Peptide, bei der Überwachung der Produktion von Proteinen und Peptiden in einem biotechnologischen Prozeß; Enzyme und ihre Substrate und Cofaktoren, beispielsweise bei Untersuchungen von Blutgerinnungsfaktoren; Proteine oder Peptide und DNA- oder RNA-Moleküle, beispielsweise bei der Mutationsanalyse durch unterschiedlich starke Bindung von veränderter DNA an bestimmte Proteine oder Untersuchungen von Transskriptionsfaktoren; und Oberflächenmoleküle von Viren, Bakterien, Pilzen, Plas

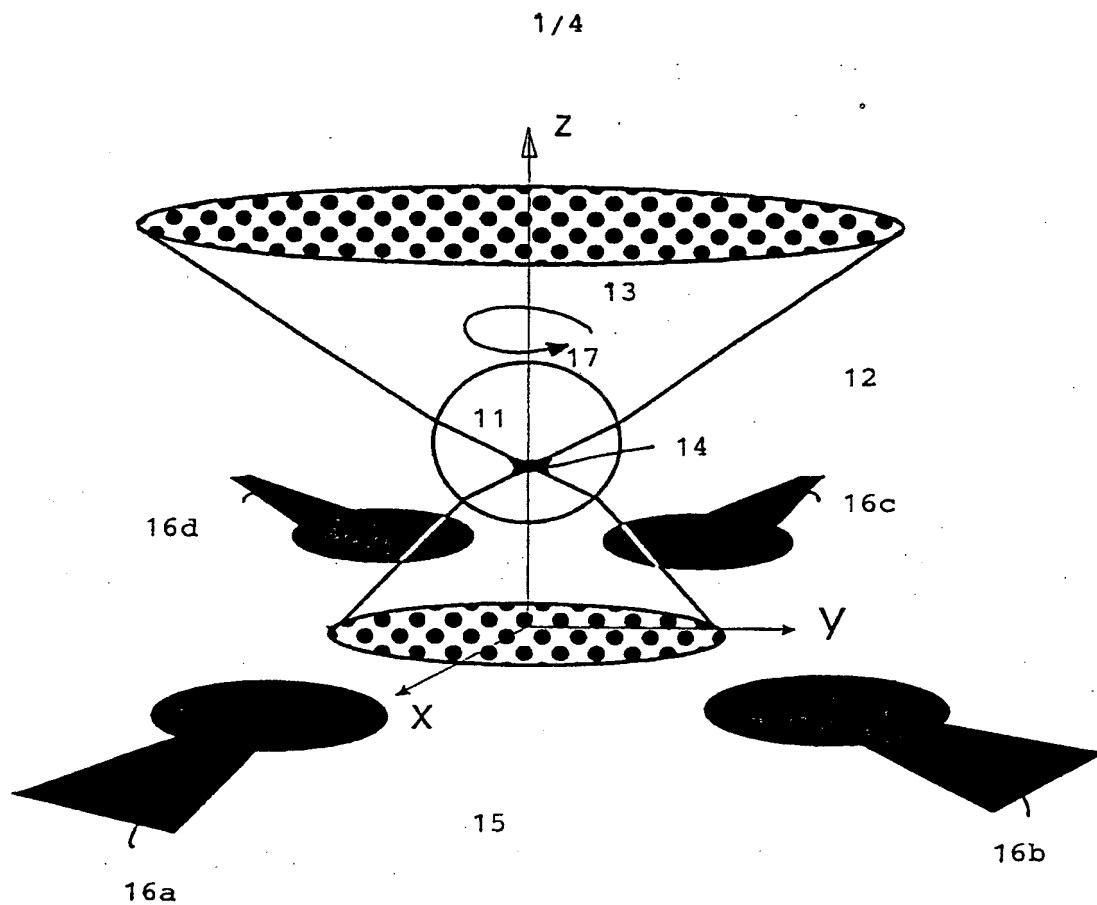
moiden oder anderen pathogenen Mikroorganismen und der Zellmembran einer Wirtszelle, beispielsweise zur Entwicklung anti-infektiver Strategien.

Ein erfindungsgemäßes Testsystem kann auch eine Vielzahl von Mikrosystemen gemäß Fig. 4, die seriell oder parallel zusammenwirken, aufgebaut sein.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur dielektrischen Spektroskopie an mindestens einem Teilchen in einem Mikrosystem, bei dem das Teilchen in einer Elektrodenanordnung hochfrequenten elektrischen rotierenden Feldern ausgesetzt und gleichzeitig frei suspendiert im Fokus einer optischen Falle gehalten wird, wobei an dem Teilchen Rotationsspektren durch Messung der Rotationsgeschwindigkeit als Funktion der Frequenz der rotierenden elektrischen Felder ermittelt werden.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem die optische Falle mit einer Lasereinrichtung erzeugt wird, die mit einer derartigen Strahlungsintensität betrieben wird, daß die optischen Kräfte in der optischen Falle stärker als feldinduzierte Anziehungs- oder Abstoßungskräfte der Elektrodenanordnung sind.
3. Verfahren gemäß Anspruch 1, bei dem mehrere optische Fallen verwendet werden, um mehrere Teilchen zu halten, und simultan oder seriell einer Rotationsspektrenmessung unterzogen zu werden.
4. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, bei dem am Teilchen eine erste und eine zweite Rotationsspektrenmessung durchgeführt werden, wobei zwischen den Rotationsspektrenmessungen das Teilchen mit einer Testsubstanz zur Wechselwirkung gebracht wird und nach der zweiten Rotationsspektrenmessung das Teilchen einem Sortiervorgang in Abhängigkeit von einer Modifizierung der dielektrischen Eigenschaften des Teilchens nach der Wechselwirkung unterzogen wird.

5. Verfahren gemäß Anspruch 4, bei dem nach der zweiten Rotationsspektrenmessung mindestens eine weitere Testsubstanz zugeführt wird und mindestens eine weitere Rotationsspektrenmessung erfolgt.
6. Vorrichtung zur dielektrischen Spektroskopie an mindestens einem suspendierten Teilchen in einem Mikrosystem, das mindestens eine Elektrodenanordnung zur Ausbildung elektrischer Rotationsfelder und eine Einrichtung zur Bildung mindestens einer optischen Falle im Wirkungsbereich der Elektrodenanordnung umfaßt.
7. Vorrichtung gemäß Anspruch 6, die zur Bildung der optischen Falle im Mikrosystem eine Lasereinrichtung und eine Mikroskopanordnung aufweist.
8. Vorrichtung gemäß Anspruch 6 oder 7, bei der im Mikrosystem ein erster Kanal (41a) mit einer ersten (42a) und mindestens einer zweiten (42b) Elektrodenanordnung jeweils mit einer ersten und einer zweiten Lasereinrichtung zur Bildung optischer Fallen vorgesehen ist, wobei zwischen den Elektrodenanordnungen (42a, 42b) in den ersten Kanal (41a) mindestens ein zweiter Kanal (41b) zur Zuführung von Testsubstanzen mündet und stromabwärts nach den Elektrodenanordnungen eine Sortiereinrichtung vorgesehen ist.
9. Verwendung einer optischen Falle (Laser-Pinzette) zur freisuspensierten Halterung von Teilchen in elektrischen Rotationsfeldern.



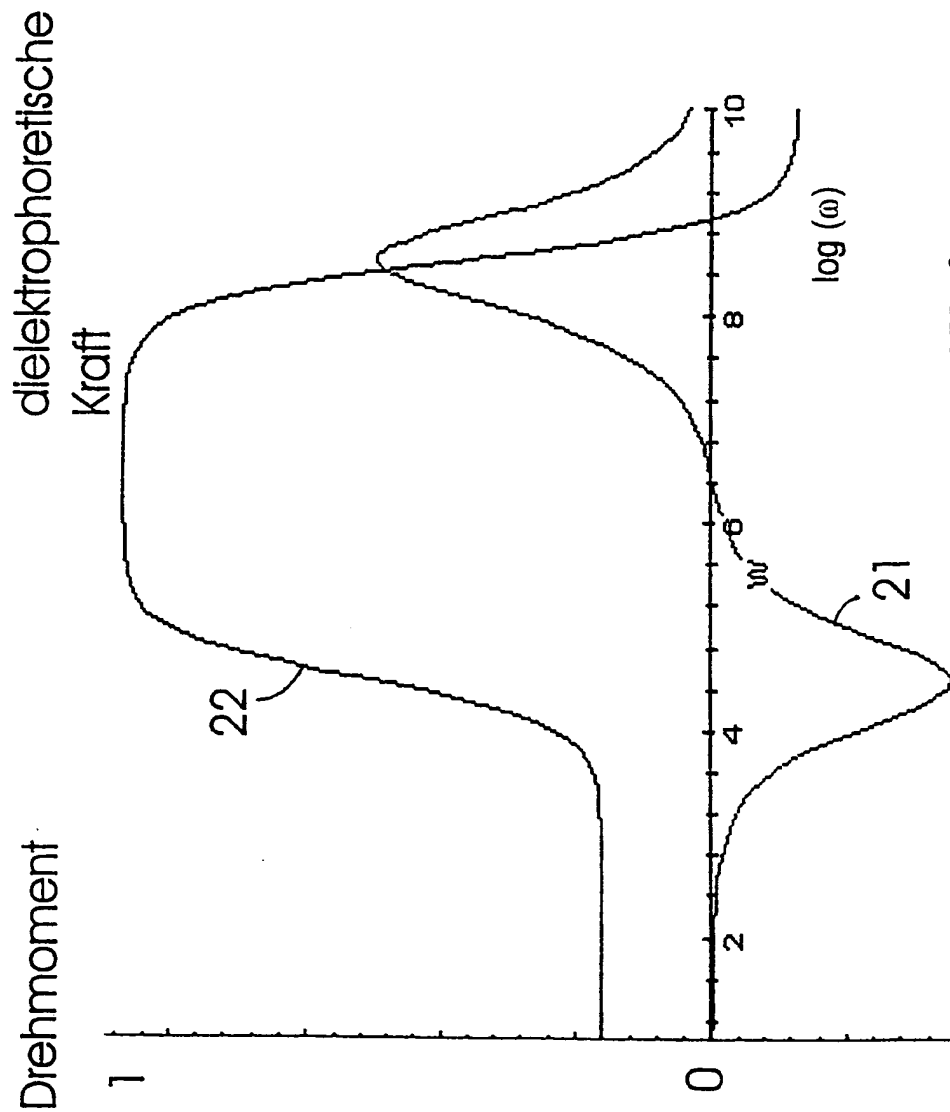
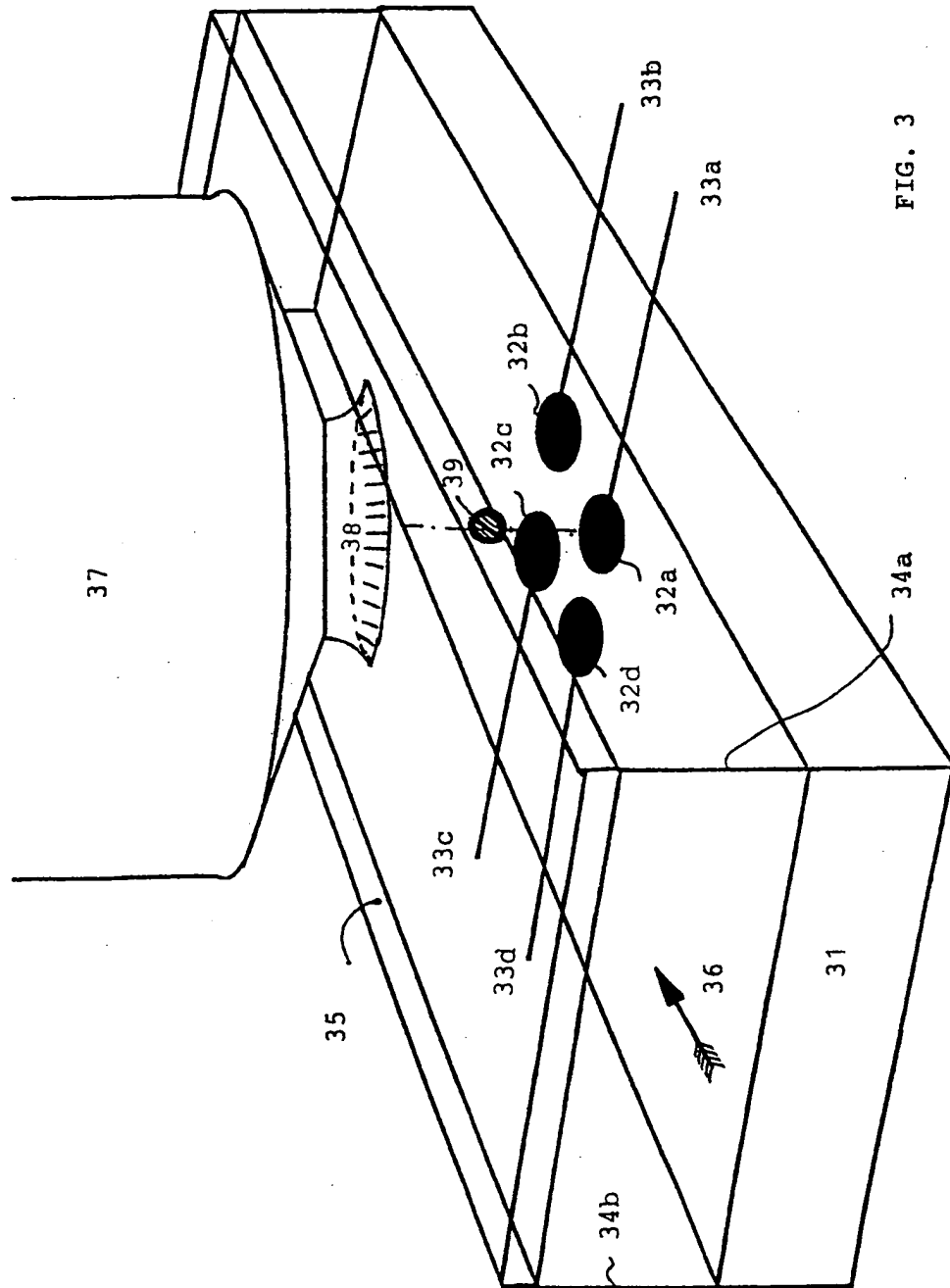


FIG. 2



4/4

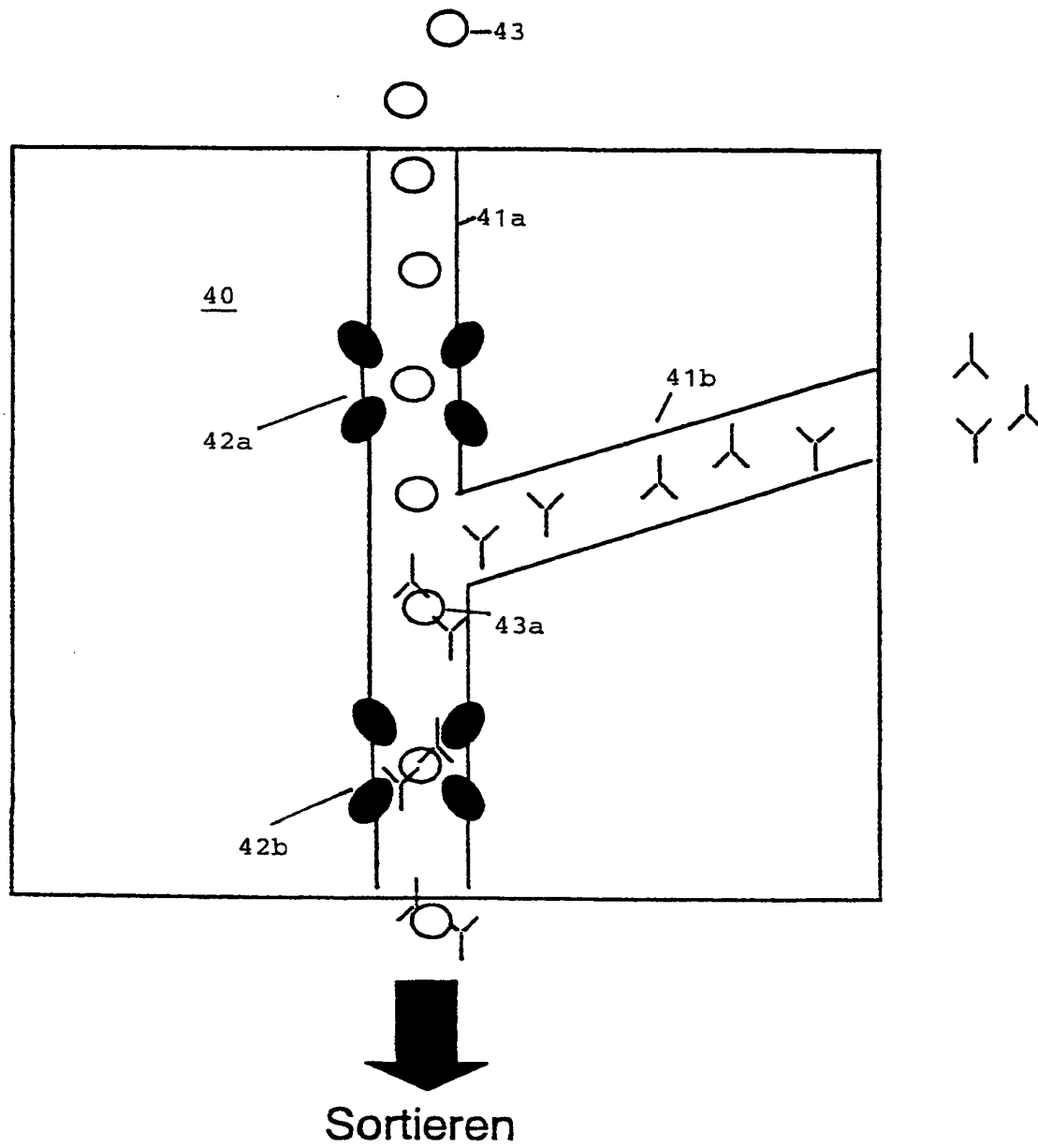


FIG. 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 99/10278

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 G01N15/14 G01N27/22 G01N33/487 B03C5/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 G01N B03C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GASPERIS DE G ET AL: "AUTOMATED ELECTROROTATION: DIELECTRIC CHARACTERIZATION OF LIVING CELLS BY REAL-TIME MOTION ESTIMATION" MEASUREMENT SCIENCE AND TECHNOLOGY, GB, IOP PUBLISHING, BRISTOL, vol. 9, no. 3, 1 March 1998 (1998-03-01), pages 518-529, XP000777488 ISSN: 0957-0233 page 521, right-hand column, last paragraph -page 523, right-hand column; figure 4	1,3,6,7,9
A	DD 256 192 A (UNIV BERLIN HUMBOLDT) 27 April 1988 (1988-04-27) the whole document	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 March 2000

Date of mailing of the international search report

29/03/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Müller, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 99/10278

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 96 41154 A (KISHORE RONI BAKHRU ;WEETALL HOWARD HAYYAM (US); HELMERSON KRISTIA) 19 December 1996 (1996-12-19) figure 1</p> <p>-----</p>	4, 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/10278

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DD 256192	A	27-04-1988	DE 3631038 A	02-04-1987
WO 9641154	A	19-12-1996	US 5620857 A	15-04-1997
			AU 6271996 A	30-12-1996
			CA 2223576 A	19-12-1996
			EP 0871861 A	21-10-1998
			JP 11507437 T	29-06-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/10278

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N15/14 G01N27/22 G01N33/487 B03C5/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 G01N B03C

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ²	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	GASPERIS DE G ET AL: "AUTOMATED ELECTROROTATION: DIELECTRIC CHARACTERIZATION OF LIVING CELLS BY REAL-TIME MOTION ESTIMATION" MEASUREMENT SCIENCE AND TECHNOLOGY, GB, IOP PUBLISHING, BRISTOL, Bd. 9, Nr. 3, 1. März 1998 (1998-03-01), Seiten 518-529, XP000777488 ISSN: 0957-0233 Seite 521, rechte Spalte, letzter Absatz -Seite 523, rechte Spalte; Abbildung 4 ---	1,3,6,7,9
A	DD 256 192 A (UNIV BERLIN HUMBOLDT) 27. April 1988 (1988-04-27) das ganze Dokument --- -/-	1-9

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

21. März 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

29/03/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Müller, T

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/10278

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>WO 96 41154 A (KISHORE RONI BAKHRU ;WEETALL HOWARD HAYYAM (US); HELMERSON KRISTIA) 19. Dezember 1996 (1996-12-19) Abbildung 1</p> <p>-----</p>	4,5

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 99/10278

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DD 256192	A	27-04-1988	DE	3631038 A	02-04-1987
WO 9641154	A	19-12-1996	US	5620857 A	15-04-1997
			AU	6271996 A	30-12-1996
			CA	2223576 A	19-12-1996
			EP	0871861 A	21-10-1998
			JP	11507437 T	29-06-1999

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO